



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Soraia Marina Calheiros Gonçalves

PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI*
STEC EM FEZES DE VACA DE PRODUÇÃO DE LEITE

Nome do Curso de Mestrado
Mestrado Zootecnia

Trabalho efetuado sob a orientação da/o
Professora Doutora Isabel Maria Barreira Afonso Paula
Doutor Gonçalo Nieto Almeida

Novembro de 2018

As doutrinas expressas neste
trabalho são da exclusividade
responsabilidade do autor.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Trato gastrointestinal de bovinos	3
2.2. Microbiota ruminal.....	3
2.3. Microrganismos patogénicos.....	4
2.3.1. Caracterização da <i>Escherichia coli</i>	4
2.3.2. Classificação de <i>Escherichia coli</i> em serotipos	5
2.3.3. Classificação de <i>Escherichia coli</i> em patótipos	6
2.3.4. Fatores de virulência de STEC	7
2.3.5. Principais fontes de contaminação.....	7
2.4. Infecções no Homem provocadas pela <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga.....	8
2.5. Tratamento de infeções	9
2.5.1. Antibióticos	9
2.5.2. Utilização de antibióticos na produção animal	10
2.5.3. Antibióticos utilizados em animais de produção	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1. Amostragem	12
3.2. Métodos de ensaio	13
3.2.1. Enriquecimento microbiano	13
3.2.2. Detecção dos genes <i>stx1/stx2</i> e <i>eae</i> por PCR multiplex no enriquecimento	14
3.2.3. Confirmação de resultados.....	15
3.2.4. Conservação de estirpes.....	18
3.3. Determinação da MIC- diluição	19
3.4. Análise estatística	19
5.DISCUSSÃO	28

6.CONCLUSÕES	33
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar nesta página os meus sinceros agradecimentos a todos, os que de alguma forma, deram o seu contributo para que me fosse possível executar este relatório.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais e ao meu namorado, o esforço que fizeram para me proporcionar as condições necessárias tanto para a realização deste mestrado como para este relatório, em particular, e por sempre terem acreditado e confiado em mim.

Ao Doutor Gonçalo Almeida meu orientador, obrigada pela orientação deste trabalho, por todos os conhecimentos transmitidos e ensinamentos, por acreditar sempre em mim e por ser uma pessoa sempre prestável e humana, o seu apoio foi incondicional, a sua paciência, compreensão e incentivo, e agradeço-lhe todo o tempo despendido na correção desta tese. Sem a sua ajuda este desafio final do meu percurso académico seria muito mais complicado. A si, o meu sincero agradecimento.

À Doutora Carina Almeida o meu muito obrigado pelo inestimável apoio prestado ao longo do meu trabalho, orientação e permanente disponibilidade para ajudar, pela sua simpatia e por estar lá sempre quando eu precisava.

A todos os funcionários do INIAV e ao próprio INIAV, em especial aos que me acompanharam diariamente: Ana Maria Silva, Engenheira Ana Pinheiro, Esperança Rodrigues, Manuela Amaral, Ricardo Oliveira e o Doutor Hugo que me trataram como uma colega de trabalho e me acolheram com amizade, respeito e boa disposição, auxiliando-me nas tarefas, confiando sempre no meu trabalho.

À Professora Isabel Afonso por todo o carinho e confiança que depositou em mim e por toda a sua disponibilidade, e por me ter proporcionado este excelente estágio.

A todos os Docentes, que de alguma forma, acompanharam o meu percurso académico e me transmitiram os conhecimentos necessários para a realização deste Mestrado.

Aos meus colegas de curso, que sempre me apoiaram e que comigo caminharam durante, este percurso.

Aos meus amigos mais próximos que através do seu apoio me ajudaram a chegar ao fim de todo este trajeto acadêmico.

Em último lugar, mas não com menos importância, aos produtores e proprietários das explorações que integram o estudo, sem o qual não seria possível a realização da componente prática deste trabalho e ao meu querido José Pedro Azevedo Ramos Pedrosa por todo o apoio prestado e auxílio nas explorações.

RESUMO

A realização deste trabalho teve como principal objetivo estudar a presença da bactéria patogénica *Escherichia coli* produtoras de toxinas shiga (*stx*) em explorações de vacas leiteiras e avaliar sua resistência a antibióticos.

Foram acompanhados um total de 80 animais distribuídos por 4 explorações. Em três das explorações (A, C e D) foram recolhidas amostras de fezes de vacas lactantes e em uma (B) foram recolhidas amostras de fezes de novilhas.

A metodologia utilizada para a deteção de STEC foi a constante na ISO/TS 13136:2012, que estabelece a pesquisa dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* no meio de enriquecimento da amostra. No caso de resultados positivos procede-se ao isolamento do microrganismo em meios seletivos. O documento estabelece, igualmente, a determinação dos principais serotipos responsáveis por infeção no Homem. Os isolados encontrados foram conservados a -80 °C. Posteriormente, foi determinada a concentração mínima inibitória (MIC) pelo método da microdiluição. Os dados foram analisados em Microsoft® Office Excel versão 2010.

Em 80 amostras recolhidas e analisadas 54 (67,5%) possuíam o gene *stx1/stx2* e 16 (20%) o gene *eae*. Em 31 amostras foi possível determinar o serotipo. A exploração com maior percentagem de animais colonizados é a B (100%) e a A (40%) é a que possuiu menos.

O gene de virulência mais prevalente foi o *stx2* e o serotipo mais comum foi o O145 não tendo sido encontrado nenhum O111.

Nas pools apenas 26,3% mostraram genes de virulência, sendo novamente a exploração B a que apresentou maior prevalência.

No fim foram conservadas 23 estirpes STEC e 61 não STEC. Realizando-se de seguida a suas resistências a agentes antimicrobianos foi possível verificar que a ampicilina é o antibiótico com maior número de isolados que apresentaram resistência, seguida da tetraciclina e da amoxicilina.

A exploração em que os isolados (STEC e não STEC) apresentaram maior resistência aos antibióticos foi a B.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, gene de virulência, antibióticos, serotipos, toxina Shiga.

ABSTRACT

The main objective of this work was to study the presence of the pathogenic bacteria Shiga Toxins (*stx*) producing *Escherichia coli* in dairy farms, and to evaluate their resistance to antibiotics.

A total of 80 animals were sampled from 4 farms. The faeces samples of 3 farms (A, C e D) were collected from suckling cows and faeces samples from the other farm (B) were collected from heifers.

The methodology used for the detection and identification of STEC followed the ISO/TS 13136:2012, which establishes the search of *stx1*, *stx2* and *eae* genes from samples enrichment growth. In the case of positive results, microorganisms were isolated using a selective media. The document also establishes the search for the main serotypes responsible for human infection in Europe. The isolates detected were stored at -80 °C. Additionally, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method. The data were analyzed in Microsoft® Office Excel version 2010.

In the 80 samples collected and analyzed 54 (67.5%) have the gene *stx1/stx2* and 16 (20%) the gene *eae*. In 31 of the samples was possible to identified one or more serotypes. The holding with the highest percentage of colonize animals is B (100%) and A (40%) have the lower percentage. The virulence gene most prevalent is *stx2* and the most common serotype is O145, in contrast there was none O111 found. Only 26.3 % of the pools had virulence genes detected, with the most prevalent being from farm B. In total 23 STEC and 61 non-STEC strains were isolated and conserved.

The exploration in which the isolates (STEC and non-STEC) show higher resistance to antibiotics is B Ampicillin is the antibiotic to which the majority of isolates presented resistance, followed by tetracycline and amoxicillin. .

Key-words: *Escherichia coli*, virulence gene, antibiotics, serotypes.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%- Percentagem

°C- Grau celsius

DAEC- *E.coli* de Aderência Difusa

E. coli- *Escherichia coli*

EIEC- *E. coli* Enteroinvasiva

EHEC- *E. coli* Enterohemorrágica

EPEC- *E. coli* Enteropatogénica

ETEC- *E.coli* Enterotoxigênica

EU- União Europeia

g- grama

h- horas

MIC- Concentração mínima de inibição

NA- Nutriente Ágar

NaCl- Cloreto de sódio

PCR- Reacção em cadeia polimerase

SHUH- Síndrome hemolítico-urémico

STEC- *Escherichia coli* produtora de shiga toxina

TBX- Ágar biliar triptona

VTEC- *E. coli* produtora de Verotoxinas

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1-	Antibióticos utilizados no presente estudo.....	10
Tabela 3.1-	Características das explorações leiteiras alvo do estudo da presença de STEC.....	12
Tabela 3.2-	Sequência de “primers” e das sondas utilizados no ensaio de PCR para a deteção dos genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i>	14
Tabela 3.3-	Sequência de “primers” e das sondas utilizados no ensaio de PCR para detetar os serogrupos.....	16
Tabela 4.1-	Resultados obtidos através das técnicas de PCR em tempo real, por exploração para a presença dos genes de virulência <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i> no enriquecimento em nTSB.....	20
Tabela 4.2-	Resultados da técnica de PCR real time para a presença dos genes de virulência <i>stx1</i> , <i>stx2</i> nas “pools”.....	22
Tabela 4.3-	Resultados da técnica de PCR real time para a presença dos genes de virulência <i>stx1</i> , <i>stx2</i> nas colónias.....	23
Tabela 4.4-	“Heatmap” do perfil de resistência dos isolados STEC.....	24
Tabela 4.5-	“Heatmap” do perfil de resistência dos isolados não produtores de STEC.....	25
Tabela 4.6-	Percentagem de antibióticos com maior resistência.....	26
Tabela 4.7-	Percentagem de resistências a antibióticos nas estirpes STEC e Não STEC conservadas por exploração.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1-	Pesagem das amostras.....	13
Figura 3.2-	Extração do ADN a partir do enriquecimento.....	14
Figura 3.3-	Exemplo de resultado do PCR para STEC do enriquecimento.....	15
Figura 3.4-	Exemplo de uma “pool”.....	15
Figura 3.5-	Diagrama de fluxo do procedimento do PCR para os genes de virulência.....	17
Figura 3.6-	Diagrama de fluxo para confirmação do procedimento e do serogrupo.....	18
Figura 4.1-	Percentagem de animais colonizados por STEC na exploração A,B,C e D	21
Figura 4.2-	Prevalência dos fatores de virulência <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i>	21

1.INTRODUÇÃO

A qualidade, segurança e autenticidade dos alimentos constituem preocupações do consumidor atual. Os consumidores esperam que os alimentos que comprem e consomem sejam apetecíveis, nutritivos e ao mesmo tempo seguros (Pfeifer *et al.*, 2004).

A *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina (STEC) é um agente patogénico para o Homem, responsável por infeções intestinais. Em casos mais graves pode evoluir para colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urémico ou púrpura trombocitopénica. A ingestão de STEC a partir de alimentos contaminados é a principal fonte de infeção (Croxen *et al.*, 2013).

Os bovinos são considerados o principal reservatório de STEC, pela presença desta bactéria na microflora do trato intestinal. Em Portugal, encontra-se pouca informação sobre a presença de STEC em alimentos, sendo importante a realização de um estudo para pesquisa da bactéria em amostras provenientes do animal (Rivero *et al.*, 2004).

Para combater estes organismos são usados antibióticos, porém o seu uso excessivo e um pouco desequilibrado tem feito com que as bactérias ganhem resistência a estes antibióticos. Esta é desenvolvida de várias formas dependendo dos modos de ação do antibiótico (Barbosa, 2007).

Muitas pessoas pensam que a resistência aos antibióticos é somente um problema dos que abusam dos antibióticos, mas isso não é a realidade. Quando as pessoas não fazem um uso correto dos antibióticos, é a saúde pública que está em risco. Mesmo que já não tome antibióticos há muito tempo, uma infeção causada por bactérias resistentes pode ser mais difícil de tratar (Barbosa, 2007).

A utilização de medicamentos veterinários é essencial na prática moderna de produção intensiva de animais para consumo humano, sendo, igualmente, uma componente muito importante do bem-estar animal. Estas substâncias evidenciam um duplo efeito. Para além da ação farmacológica esperada, são capazes de promover um aumento substancial na eficácia da conversão dos alimentos, promovendo um maior ganho diário em peso. Porém, estas práticas podem

ocasionar, nos produtos alimentares obtidos desses animais, o aparecimento de resíduos das substâncias farmacológicas utilizadas (Barbosa, 2007).

Os objetivos do trabalho consistiram na pesquisa de STEC em amostras de fezes de vacas por detecção dos genes *stx1* e *stx2* e posteriormente estudar a resistência utilizando os antibióticos mais aplicados na pecuária tanto nos isolados de STEC e não STEC.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Trato gastrintestinal de bovinos

As funções primárias do trato gastrintestinal e de seus órgãos acessórios são a digestão e a absorção de nutrientes essenciais para os processos metabólicos. Portanto, o bom desenvolvimento e funcionamento do sistema digestivo está diretamente relacionado ao desempenho zootécnico e a sanidade dos animais, tendo como consequência a melhoria da produtividade (Oliveira, Zanini e Santos, 2007; Signoretti *et al*, 2011).

Os ruminantes são animais poligástricos, que possuem um sistema digestivo diferenciado e complexo que permite uma melhor utilização de material fibroso comparado aos animais monogástricos. O estômago é dividido em quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso denominados de pré-estômago e o abomaso caracterizado como o estômago verdadeiro (Carvalho *et al*, 2003).

2.2. Microbiota ruminal

A microbiota ruminal é complexa e diversa, sendo composta de protozoários ciliados e flagelados, fungos e bactérias. É composta, na sua grande parte, por uma população de protozoários anaeróbios e não patogênicos que fermentam alimentos fibrosos, contribuindo para a nutrição dos hospedeiros. Os protozoários ciliados podem variar entre 10^4 até 10^6 por mL de conteúdo ruminal (Kamra, 2005). Apesar da importância metabólica dos protozoários, as bactérias são os microrganismos mais ativos na produção enzimática desempenhando um papel fundamental na digestibilidade de fibras do rúmen (Arcuri e Matos, 1992).

O bovino possui um reservatório de *E. coli* (Mercado, 2007), eliminando-as pelas fezes, que, de maneira direta ou indireta (Rivero *et al.*, 2004), podem atingir os seres humanos via cadeia alimentar.

As estirpes de *E. coli* encontram-se em elevada proporção na população microbiana intestinal do bovino. As *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) são raramente as estirpes predominantes encontradas no rúmen ou intestino do bovino (Callaway *et al.*, 2003), no entanto, há evidências que a presença STEC O157:H7

nas carcaças de bovinos seja devido a contaminação fecal ocorrida durante o abate, é raro isso acontecer mas poderá ocorrer.

2.3. Microrganismos patogénicos

São muito diferentes daqueles que povoam em grande quantidade nas nossas vidas quotidianas: eles são capazes de produzir doenças infecciosas nos seus hospedeiros em condições favoráveis à sua sobrevivência e desenvolvimento, produzem compostos tóxicos e podem ser transmitidos pelo ar ou pelo consumo de alimentos contaminados por manipulação e processamento inadequados. Nas ocorrências de intoxicação e infeção alimentar, o período de incubação, a gravidade e a duração da doença podem ser diferentes, em função da idade, do estado nutricional e imunológico, da sensibilidade individual e da quantidade de alimento ingerido. Não somente os seres humanos são afetados, mas sabe-se que todos os seres vivos podem ter infeções provenientes da exposição a um agente patogénico.

As bactérias patogénicas mais associadas à transmissão pela carne são a *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* O157:H7. Como agentes patogénicos, salientam-se ainda os vírus e os parasitas, como a *Taenia saginata*, e os priões, como é o caso da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) (Gil, 2000).

A *E. coli* está presente em diversos ambientes na natureza. A maior parte das espécies existentes é inofensiva e está presente no trato intestinal natural de mamíferos. Contudo, existem algumas variedades de *E. coli* fortemente patogénicas que provocam hemorragias e até a morte.

2.3.1. Caracterização da *Escherichia coli*

Theodor Escherich, bacteriologista alemão, foi o primeiro a descrever em 1885 o isolamento de uma bactéria de fezes de crianças, designada na altura *Bacterium coli*. Em 1920, com os crescentes casos de gastroenterites provocadas por esta bactéria, esta foi renomeada de *Escherichia coli* (Roberts *et al.*, 1996).

O género *Escherichia* consiste em bacilos anaeróbios facultativos de Gram negativo pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. A espécie *E. coli* está amplamente distribuída no ambiente e é a principal colonizadora do intestino grosso em animais de sangue quente. Embora a maioria das estirpes seja inócua no cólon e raramente cause doenças em indivíduos saudáveis, existem algumas estirpes patogénicas que podem causar doenças intestinais e extraintestinais em indivíduos saudáveis ou imunodeprimidos (Kaper *et al*, 2004).

A diarreia é um dos problemas de saúde pública e uma das maiores causas de morbilidade e mortalidade em bebés e crianças. Alguns países africanos, asiáticos e latino-americanos são das regiões mais afetadas com diarreia e com mortes mais frequentemente associadas às más condições de higiene e de saneamento, à educação insuficiente e à pouca água tratada disponível (Croxen *et al.*, 2013). As estirpes de *E. coli* envolvidas em doenças que causam diarreia são um dos agentes etiológicos mais importantes, uma vez que estas estirpes evoluíram pela aquisição, através da transferência horizontal de genes, de um conjunto particular de características que persistiram com sucesso no hospedeiro (Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004; Croxen *et al.*, 2013).

2.3.2. Classificação de *Escherichia coli* em serotipos

A serotipagem de *E. coli* baseia-se nas diferenças antigénicas encontradas em certas estruturas superficiais das células bacterianas. Os três antígenos fundamentais são O, K e H. Os antígenos somáticos “O” termoestáveis são relacionados com polissacarídeos da membrana externa, os antígenos “H” termolábeis relacionados com proteínas dos flagelos, enquanto que os antígenos capsulares “K” termoestáveis são relacionados com polissacarídeos capsulares. Os antígenos de fímbrias formam um quarto sistema de serotipagem, especificamente para as estirpes que apresentam essas estruturas (FRANCO, 2002). Mais de quatrocentos serotipos O:H de EHEC têm sido isolados de bovinos, o que torna seu estudo necessário e importante devido ao envolvimento direto na causa de doenças gastrintestinais humanas (Bettelheim *et al* 2005).

2.3.3. Classificação de *Escherichia coli* em patótipos

Existem seis principais grupos patogênicos de *E. coli* que afetam o intestino dos seres humanos: *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), também chamada *E. coli* produtora de verotoxinas (VTEC); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que é um subgrupo de STEC/VTEC, onde se inclui o principal serotipo *E. coli* O157:H7, provavelmente a *E. coli* patogênica mais importante em termos de infecções alimentares; *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (Farrokh *et al.*, 2013).

As STEC, também chamadas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) ou de *E. coli* verotoxigênicas (VTEC), compreendem uma classe de estipes de *E. coli* produtoras de verotoxinas, incluindo a *E. coli* O157:H7, associada à enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades. O síndrome é decorrente da adesão às células epiteliais intestinais e à ação de citotoxinas produzidas no intestino do indivíduo infetado. Até à data, são conhecidas pelo menos duas citotoxinas diferentes, chamadas de verotoxinas (VTI e VTII) devido ao seu efeito citopático irreversível sobre células Vero (linhagem de células do rim do macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*). Também são chamadas de toxinas shiga ou “shiga-like” toxinas (stx1 e stx2), devido à semelhança com a toxina produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo I (Weagant *et al.*, 1995).

Entretanto, distinguir as estirpes STEC verdadeiramente patogênicas não é simples, uma vez que a produção das verotoxinas não é suficiente para conferir virulência, havendo outros fatores envolvidos. Isso teve reflexos sobre a nomenclatura desse grupo, sendo STEC e VTEC termos equivalentes e ambos se referem a todas as estirpes de *E. coli* que produzem uma ou mais verotoxinas (Nataro e Kaper, 1998).

Como não está claro se a simples presença dos genes que codificam essas toxinas é capaz de conferir patogenicidade, na ausência de outros fatores de virulência, o termo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) fica reservado às estirpes que provocam colite hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) ou púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), produzem toxinas shiga, aderem às células do epitélio intestinal provocando lesões A/E (“attaching and effacing”) e possuem o

plasmídeo pO157 associado à produção de enterohemolisinas e potenciais fatores de aderência. Dessa forma, EHEC denota um subgrupo da classe STEC e inclui uma conotação clínica não extensiva a todo o grupo. De acordo com essa definição, todas as estirpes EHEC são patogênicas, sendo o principal representante o serotipo O157 (Griffin e Tauxe, 1991).

2.3.4. Fatores de virulência de STEC

As toxinas Shiga constituem o principal fator de virulência das STEC, sendo possível caracterizar dois grupos principais: stx1, que difere apenas num aminoácido da toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* serotipo 1; e stx2 que possui uma similaridade em torno de 60% com stx1 na sequência de aminoácidos (Hunt, 2010). Ambas possuem diferentes variantes antigênicas que podem ou não estar associadas com uma doença grave. Uma única célula pode possuir um ou mais genes *stx*. A informação genética para a produção de stx1 e stx2 está localizada no genoma de bacteriófagos do tipo lambda integrados no cromossoma das STEC (Caprioli *et al.*, 2005). A literatura descreve que as células que produzem apenas stx2 são mais patogênicas do que as que só produzem stx1 ou ambas, estando mais frequentemente associadas à SUH (Paton e Paton, 1998; Stephan *et al.*, 2008). Além das *stx*, as STEC podem estar envolvidas numa aderência íntima que destrói as microvilosidades intestinais e induz a formação de uma estrutura em forma de pedestal caracterizando a lesão A/E (“attaching and effacing”) (Lorusso *et al.*, 2009). Estudos com células epiteliais em cultura revelaram que a lesão A/E envolve a ação conjunta da proteína da membrana externa, intimina, que é codificada pelo gene *eae* (China *et al.*, 1996).

2.3.5. Principais fontes de contaminação

Escherichia coli habita essencialmente o trato intestinal dos homens e outros animais de sangue quente, constituindo a flora intestinal. Refira-se, contudo, que alguns serotipos são patogênicos para o Homem e outros animais (ASAE, 2016).

A transmissão de infecções por *E.coli* ocorrem por contacto direto com animais, contacto com humanos e, por último através do consumo de alimentos contaminados (ASAE, 2016).

É importante salientar que existem outras vias de contaminação de alimentos, desde água de rega contaminada com esgotos humanos e animais e ainda a existência de animais e portadores assintomáticos (ASAE, 2016).

A presença de STEC no ambiente é, também, motivo de preocupação, uma vez que, esta bactéria pode sobreviver no solo, nos dejetos dos animais, nas pastagens e na água, representando veículos importantes de transmissão (Lascowski *et al.*, 2013). Tendo em conta que os dejetos dos animais são muito úteis como fertilizantes orgânicos para o solo na agricultura, a deteção destas estirpes nestes fertilizantes orgânicos representa um risco significativo de segurança para a saúde pública (Puño-Sarmiento *et al.*, 2014).

2.4. Infecções no Homem provocadas pela *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga

Sabe-se que o primeiro surto de STEC mais concretamente O157 foi nos Estados Unidos da América em 1982 tendo sido provocado por ingestão de hambúrguer de carne de uma cadeia “fast food” (Riley *et al.*, 1983). Posteriormente outros surtos de O157:H7 ocorreram nos Estados Unidos devido à ingestão de água contaminada (Swerdlow *et al.*, 1992).

Em 2011 surge um surto na Alemanha, sendo este o primeiro surto na Europa devido a um serotipo, até à altura, não associado a STEC. Foram reportados 3222 casos dos quais 810 evoluíram para SUH. A estirpe bacteriana foi caracterizada como pertencente ao serotipo O104:H4 e era portadora do gene *stx* mas não possuía o gene *eae*. Sendo assim considerada como uma estirpe híbrida STEC-EAEC. (Frank *et al.*, 2011).

Em 2015 foi a quarta maior zoonose reportada na UE, com 5901 casos confirmados, resultando apenas em 8 mortes. As elevadas taxas de hospitalização foram reportadas na Grécia, Itália e Letónia (EFSA e ECDC, 2016).

Portugal apresentou registos pela primeira vez em 2015, e assim, o denominador da população global aumentou, levando a uma taxa ligeiramente inferior em relação a 2014 (EFSA e ECDC, 2016).

Estudos com STEC têm revelado variações nos padrões epidemiológicos das toxinfecções causadas por estes microrganismos em diversas partes do mundo (Vaz *et al.*, 2004).

2.5. Tratamento de infecções

2.5.1. Antibióticos

Os antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos, como bactérias ou fungos, que têm como função principal eliminar ou diminuir a quantidade de um outro microrganismo em competição por determinado espaço ou alimento. Estes podem ser classificados como bacteriostáticos caso inibam o crescimento das bactérias, ou como bactericidas caso provoquem a sua morte. Para além desta classificação, os antibióticos atuam através de diferentes mecanismos tornando-se possível distingui-los pelo seu modo de ação (Sousa, 2006).

Quanto à sua origem, os antibióticos podem ser naturais, semissintéticos ou sintéticos (Walsh, 2003). Atualmente, muitos deles são sintetizados em laboratório apresentando modificações químicas que visam a melhoria da sua potência ou a ampliação do seu espectro de ação.

Na tabela 2.1, estão enumerados os antibióticos que foram usados neste estudo, com as suas respetivas classes e mecanismos de ação na determinação da MIC.

Tabela 2.1 - Antibióticos utilizados no presente estudo

Classe	Antibiótico	Mecanismo de ação
Penicilinas	Ampicilina	Inibem a transpeptidação do peptidoglicano. Ativam enzimas líticas da parede celular
	Amoxicilina	
Cefalosporinas	Cefalexina	
Sulfonamidas/Trimetoprim	Trimetoprim-Sulfametoxazol	Bloqueiam a síntese de ácido fólico
Aminoglicosídeos	Gentamicina	Ligam-se à subunidade 30S do ribossoma, alterando a leitura no mRNA de modo a inibir a síntese proteica
Tetraciclinas	Tetraciclina	
Cloranfenicol	Cloranfenicol	Ligam-se à subunidade 50S do ribossoma, inibindo o alongamento da tradução
Quinolonas	Ciprofloxacina	Inibem a DNA girase e a topoisomerase IV, bloqueando a replicação e a transcrição

2.5.2. Utilização de antibióticos na produção animal

Os agentes antimicrobianos são utilizados em animais de produção por diversos motivos, terapêuticos quando o uso específico é para tratamento e eliminação de uma infecção bacteriana existente, para uso metafilático quando o antimicrobiano é utilizado para fins de tratamento de um grupo de animais, após surgimento de sinais clínicos da doença, por motivos profiláticos é administrado o antimicrobiano de forma individual para prevenção da doença antes da sua ocorrência (um dos exemplos do uso profilático e terapêutico dos antimicrobianos em vacas leiteiras é o tratamento da vaca seca no final da lactação), e por fim na alimentação dos animais de produção os antimicrobianos são usados em doses subterapêuticas, na alimentação dos animais, pois promovem uma boa conversão alimentar, melhorias no desempenho, e diminuem a mortalidade devido a redução nas infecções clínicas e subclínicas, apesar de não ser conceitualmente correto, é bastante empregado na indústria.

2.5.3. Antibióticos utilizados em animais de produção

Os antibióticos mais utilizados nos animais de produção são os β -lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cefalotina, cefoperazona, ceftiofur e penicilina G); as tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina); os aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina); as fluoroquinolonas (enrofloxacina, danofloxacina); os macrolídeos (eritromicina); as lincosamidas e por fim as sulfonamidas (sulfametazina).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostragem

Para este trabalho foram recolhidos um total de 80 amostras de fezes de bovinos provenientes de 4 explorações leiteiras diferentes, numa área geográfica que abrange a cidade de Barcelos e a Vila de Ponte de Lima (Tabela 3.1). As amostras são pertencentes a vacas em lactação e novilhas, pertencentes predominantemente à raça Holstein Frísia. A colheita foi realizada em períodos de tempo diferentes: a exploração A em Novembro, a B em Dezembro, a C em Janeiro e a D em Fevereiro. Logo após a colheita as amostras foram transportadas para o laboratório, onde se procedeu à pesquisa de STEC.

Tabela 3.1 - Características das explorações leiteiras alvo do estudo da presença de STEC

Exploração	Proprietário	Localidade	Número de animais totais	Regime	Alimentação
A	-	Barcelos	150	Intensivo	Silagem/palha Silagem de erva Silagem de milho Concentrado
B	-	Barcelos	212	Intensivo	Silagem/palha Silagem de erva Silagem de milho Concentrado
C	-	Ponte de Lima	100	Intensivo	Silagem/palha Silagem de erva Silagem de milho Concentrado
D	-	Barcelos	60	Intensivo	Silagem/palha Silagem de erva Silagem de milho Concentrado

Em cada exploração visitada foram recolhidas 20 amostras de forma aleatória, originando um total de 80, as amostras de fezes foram colhidas diretamente do reto dos animais, para frascos esterilizados, sendo devidamente acondicionados em caixa de material isotérmico e transportadas para o laboratório, onde foram submetidas a análises microbiológicas.

3.2. Métodos de ensaio

A deteção de STEC, realizou-se através da norma ISO/TS 13136:2012, “Microbiology of food and animal feed e Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens athogens hogemethod for the detection of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroupsgr

3.2.1. Enriquecimento microbiano



Foram pesadas 10 g de fezes para saco de “stomacher” com filtro, adicionaram-se 90 g de meio nTSB (Caldo Triptona Soja Novobiocina) e homogeneizou-se em misturador peristáltico.

Os sacos foram incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 h a 24 h.

Figura 3.1 – Pesagem das amostras

3.2.2. Detecção dos genes *stx1/stx2* e *eae* por PCR multiplex no enriquecimento



Figura 3.2- Extração do ADN a partir do enriquecimento

Após incubação procedeu-se à extração de ADN. Retirou-se 1 ml da cultura de nTSB para um tubo “eppendorf” e centrifugou-se durante cinco minutos. Rejeitou-se o sobrenadante do tubo e ressuspendeu-se o sedimento em 250 microlitros de reagente de lise. Seguidamente, passou-se para uma placa “deepwell”, a qual foi submetida a agitação e aquecimento a 98 °C durante 15 minutos. De

seguida realizou-se o PCR multiplex para detectar sequências *eae*, *stx1* e *stx2*, das STEC, utilizando, respectivamente, os pares de “primers” *eaeR* e *eaeF*, *stx1R* e *stx1F*, *stx2R* e *stx2F* e as suas respectivas sondas (tabela 3.2). O volume final utilizado foi de 25µl e as concentrações de “primers” foram de 500nM e das sondas de 200nM.

A amplificação é obtida aplicando-se múltiplos ciclos de PCR, sob as seguintes condições: 95°C durante três minutos; 42 ciclos a 95°C por 15 segundos; 56°C por 25 segundos; 65°C por 30 segundos.

Tabela 3.2 - Sequência de “primers” e das sondas utilizados no ensaio de PCR para a detecção dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*.

Alvo do “primer”	Sequência do “primer”
<i>Stx1/2</i> Fwd	5' - TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG – 3'
<i>Stx1/2</i> Rev	5' – CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC – 3'
<i>Stx1</i> Sonda	5' – [FAM] CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A – 3'
<i>Stx2</i> Sonda	5' – [HEX] GGA GCA GTT TCA GAC AGT GCC TGA CGA – 3'
<i>Eae</i> Fwd	5' – CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA – 3'
<i>Eae</i> Rev	5' – CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA – 3'
<i>Eae</i> Sonda	5' – [Cy5] ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC – 3'

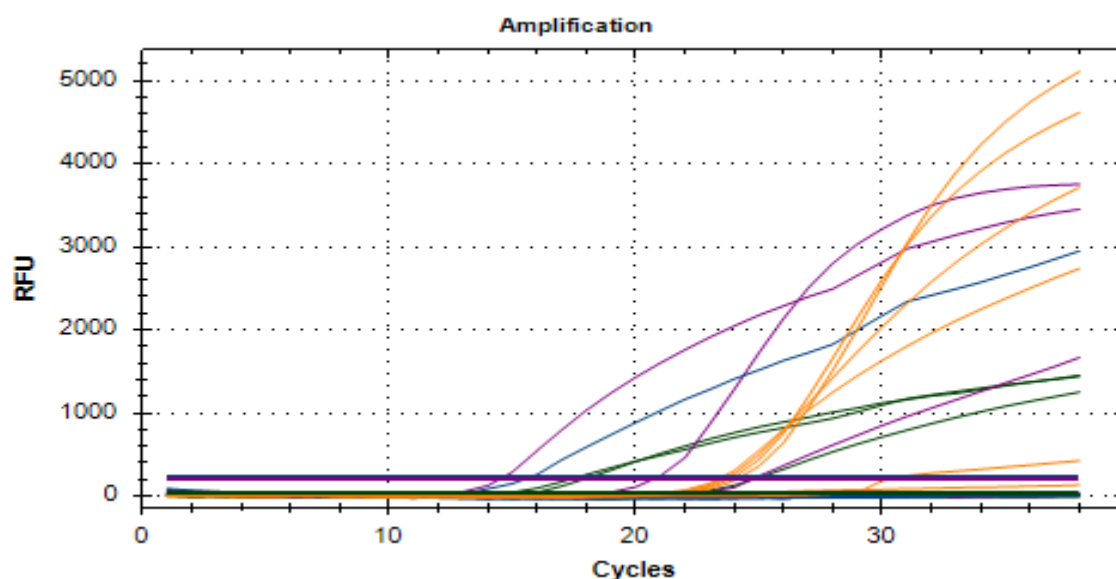


Figura 3.3- Exemplo resultado do PCR para STEC do enriquecimento

Lilás – EAE; Azul – Stx1; Verde – Stx2; Laranja – IAC

3.2.3. Confirmação de resultados

Se os resultados do PCR para *stx1*, *stx2* e *eae* foram negativos no enriquecimento a análise da amostra ficou concluída, dando o resultado como amostras não portadoras dos genes de virulência *stx1*, *stx2* e *eae*, ou seja não STEC.



Figura 3.4- Exemplo de uma “pool”

Pelo contrário, se as amostras foram positivas teremos que continuar o estudo. A partir do enriquecimento isolamos em meio sólido adequado, neste caso TBX (“Tryptone Biliar X-glucoside”) e incuba-se por 18 h a 24 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, selecionaram-se 50 colónias com morfologia típica de *E.coli* e inoculou-se com ansa em nutriente ágar (NA) suspendendo o restante em tubo “eppendorf” contendo água. Em cada tubo “eppendorf” foi suspenso o inóculo correspondente a 10 colónias (pool de 10 colónias). De cada uma das “pools” procedeu-se à deteção de *stx* e *eae*. Das “pools”

positivas para os genes de virulência realizou-se novo PCR para as colónias individuais de modo a identificar qual a colónia correspondente a STEC. De seguida determinou-se o serogrupo.

Para a determinação dos serogrupos utilizaram-se os “primers” e sondas constantes da tabela 3.3. As condições de amplificação foram as mesmas que as utilizadas para detetar as sequências *eae*, *stx1* e *stx2*, assim como as concentrações de “primer” e sondas.

Tabela 3.3 - Sequência de “primers” e das sondas utilizados no ensaio de PCR para detetar os serogrupos

wbdl (O111) Fwd	5' – CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GCT TT – 3'
wbdl (O111) Rev	5' – TTT TTG AAT AGT TAT GAA CAT CTT GTT TAG C – 3'
wbdl (O111) Sonda	5' – [FAM] TTG AAT CTC CCA GAT GAT CAA CAT CGT GAA - 3'
wzx (O26) Fwd	5' – CGC GAC GGC AGA GAA AAT T – 3'
wzx (O26) Rev	5' – AGC AGG CTT TTA TAT TCT CCA ACT TT – 3'
wzx (O26) Sonda	5' – [FAM] CCC CGT TAA ATC AAT ACT ATT TCA CGA GGT TGA – 3'
ihp1 (O145) Fwd	5' – CGA TAA TAT TTA CCC CAC CAG TAC AG – 3'
ihp1 (O145) Rev	5' – GCC GCC GCA ATG CTT – 3'
ihp1 (O145) Sonda	5' – [FAM] CCG CCA TTC AGA ATG CAC ACA ATA TCG – 3'
wzx (O103) Fwd	5' – CAA GGT GAT TAC GAA AAT GCA TGT – 3'
wzx (O103) Rev	5' – GAA AAA AGC ACC CCC GTA CTT AT – 3'
wzx (O103) Sonda	5' – [FAM] CAT AGC CTG TTG TTT TAT – 3'
wzx (O104) Fwd	5' – TGT CGC GCA AAG AAT TTC AAC – 3'
wzx (O104) Rev	5' – AAA ATC CTT TAA ACT ATA CGC CC – 3'
wzx (O104) Sonda	5' – [FAM] TTG GTT TTT TTG TAT TAG CAA TAA GTG GTG TC – 3'
rfbE (O157) Fwd	5' – TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A – 3'
rfbE (O157) Rev	5' – CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT – 3'
rfbE (O157) Sonda	5' – [FAM] AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG – 3'
pUC19 Fwd	5' – GCA GCC ACT GGT AAC AGG AT – 3'
pUC19 Rev	5' – GCA GAG CGC AGA TAC CAA AT – 3'
pUC19 Sonda	5' – [ROX] AGA GCG AGG TAT GTA GGC GG – 3'

Os esquemas a baixo facilita toda a interpretação da metodologia:

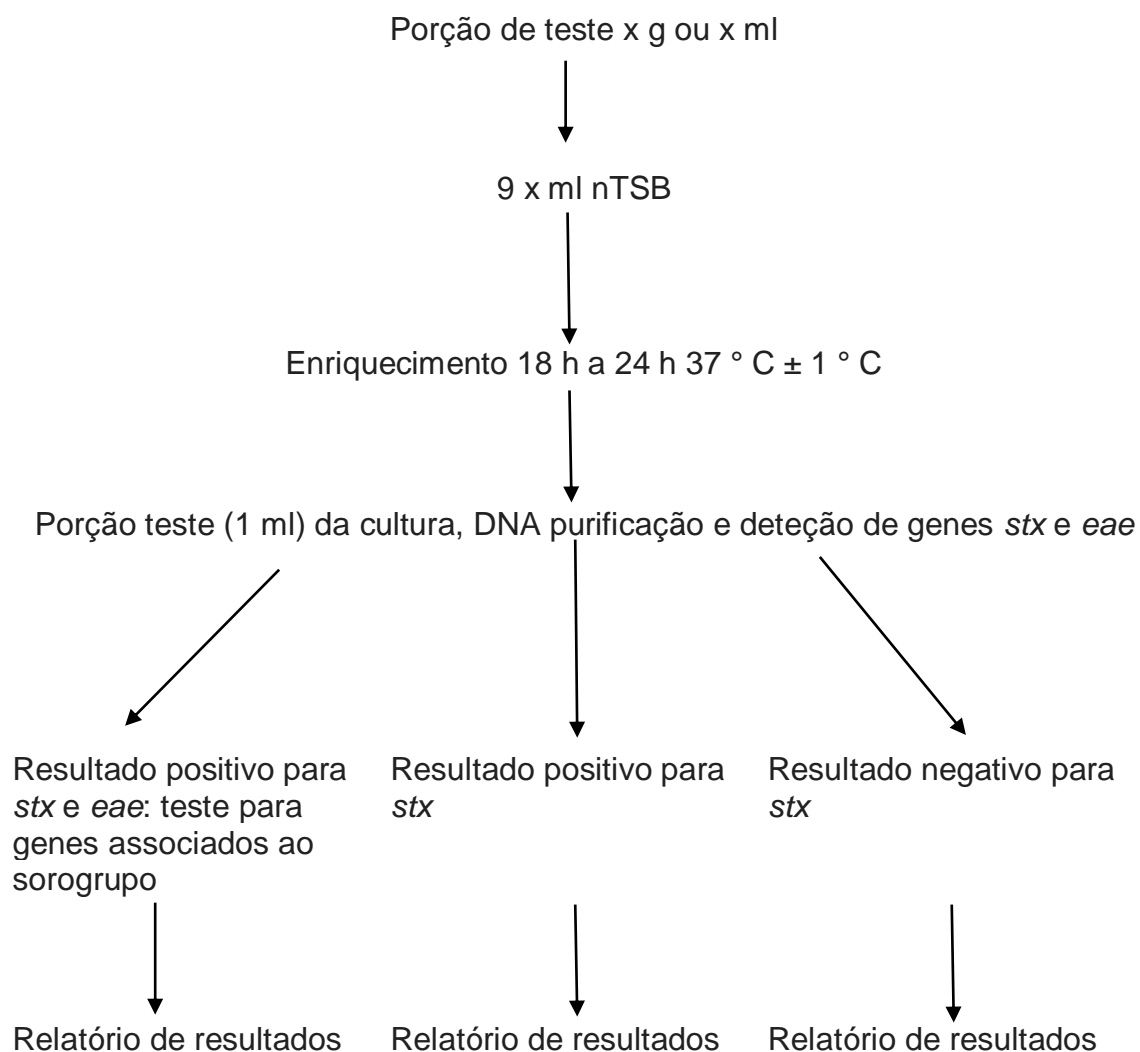


Figura 3.5- Diagrama de fluxo do procedimento do PCR para os genes de virulência

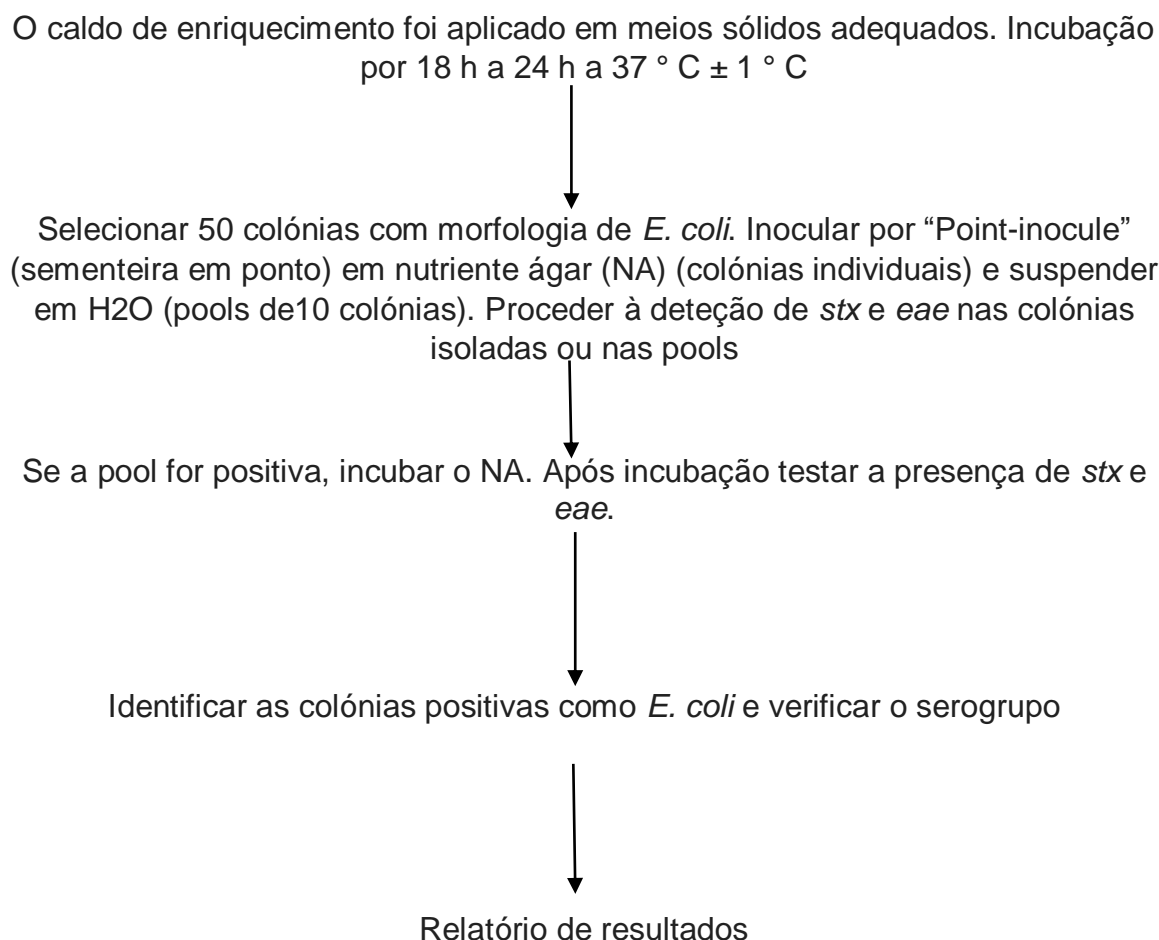


Figura 3.6- Diagrama de fluxo para confirmação do procedimento e do serogrupo

3.2.4. Conservação de estirpes

No final quando detetou-se a colónia positiva repicou-se novamente para NA para se realizar os crioviais dessas estirpes. Nesses crioviais identificou-se a estirpe, os seus genes de virulência e até mesmo os seus serotipos e a data de conservação.

Mas também conservou-se as amostras negativas para STEC, para estudar a resistência aos antibióticos.

3.3. Determinação da MIC- diluição

A concentração mínima inibitória (MIC), é a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede crescimento visível de um microrganismo no teste de sensibilidade por diluição em caldo. Este método segue a norma M27-A2, 30 de Novembro de 2017.

Foram preparadas as diluições dos antibióticos, e posteriormente à preparação do inóculo, repicou-se as estirpes em meio ágar apropriado e incubou-se. A partir daí o inóculo foi preparado escolhendo-se cinco colónias com diâmetro de aproximadamente 1mm de cultura. As colónias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5 g/L NaCl; salina a 0,85%). A suspensão resultante foi colocada em agitador de “vórtex” durante 15 segundos e a densidade celular, ajustada com espectrofotómetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter o resultado equivalente de uma solução-padrão.

O teste de microdiluição foi realizado em placas de microdiluição estéreis, descartáveis de 96 poços em formato de U. As concentrações dos antibióticos foram dispensadas nos poços das fileiras 1 a 10 das placas de microdiluição, em volumes de 100 µL, com uma pipeta multicanal. A fileira 1 conteve a maior concentração de antibiótico (64 ou 16 µg/mL) e a fileira 10 a menor concentração (0,12 ou 0,03 µg/mL). Essas placas foram cobertas com filme plástico, colocadas em sacos de plástico e armazenadas congeladas à temperatura -70° C, por até seis meses, sem deterioração da potência da droga testada. Em cada poço da placa de microdiluição inoculou-se 100 µL de suspensão do inóculo 2 vezes concentrada e incubou-se a 37 °C. Foram realizados controlo positivo e negativo.

Após a incubação da microplaca, o crescimento microbiano foi determinado por leitura espectrofotometria a 600-630 nm no espectrofotómetro.

3.4. Análise estatística

Os dados recolhidos foram posteriormente exportados individualmente para uma folha de cálculo do programa informático Microsoft® Office Excel versão 2010, sendo executada a validação da base de dados para subsequente tratamento estatístico.

4.RESULTADOS

A pesquisa de STEC, num total de 80 amostras de fezes de vacas, das quatro explorações revelou que os genes de virulência *stx1/stx2* foram detetados no enriquecimento de 54 amostras (67,5%) e o gene *eae* foi detetado no enriquecimento de 16 amostras (20%). Em 31 amostras foi possível determinar a presença de um ou mais dos seis serogrupos testados. Os resultados obtidos no enriquecimento encontram-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1- Resultados obtidos através das técnicas de PCR em tempo real, por exploração para a presença dos genes de virulência *stx1*, *stx2* e *eae* no enriquecimento em nTSB

Animal	Enriquecimento em nTSB															
	Exploração A				Exploração B				Exploração C				Exploração D			
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	Serotipos	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	Serotipos	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	Serotipos	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	Serotipos
1	+	-	+	O145;O103	+	+	-	NT	-	-	-	NA	-	-	-	NA
2	-	-	+	NA	+	+	-	O26;O145	-	+	-	NT	-	-	-	NA
3	-	-	+	NA	+	+	-	O145;O104	-	+	-	O145;O103	-	+	-	NT
4	+	-	+	O103	+	+	-	O145;O157	-	+	-	NT	-	+	-	NT
5	-	+	-	NT	+	+	-	O26;O145	-	+	-	O145;O103	-	+	-	NT
6	+	-	-	NT	+	+	-	O26;O145	-	-	-	NA	-	-	-	NA
7	-	-	+	NA	+	+	-	O145	+	+	-	O145	-	+	-	NT
8	-	-	-	NA	+	+	-	O157	+	+	-	O145	-	+	-	NT
9	-	-	-	NA	+	+	-	NT	-	-	-	NA	-	+	+	O26
10	-	-	-	NA	-	+	-	O145	-	+	-	O145	-	+	+	O26
11	-	-	-	NA	-	+	-	O145	-	+	-	NT	-	+	+	NT
12	+	+	-	NT	+	+	-	O145	-	-	-	NA	-	-	-	NA
13	-	-	-	NA	-	+	-	O145;O103	-	-	-	NA	-	-	+	NA
14	-	-	-	NA	-	+	-	NT	+	+	-	O145	-	-	+	NA
15	+	-	+	NT	-	+	-	NT	-	+	-	O145	-	-	+	NA
16	-	+	-	O145;O103	+	+	-	O26;O145	-	+	-	NT	+	+	-	NT
17	-	-	+	NA	+	+	-	O145	-	+	-	O145	-	-	-	NA
18	+	-	+	NT	+	+	-	O26;O145;O157	+	+	-	O145	-	+	+	NT
19	-	-	-	NA	+	+	-	O26;O157	-	-	-	NA	-	+	+	O145
20	-	-	-	NA	+	+	-	O26;O145;O157	+	+	-	NT	-	+	-	NT

NA (Não aplicado a pesquisa de serotipos)/ **NT** (Não tipado, ou seja não se detetou nenhum serotipo)

Como podemos constatar, na exploração A encontramos oito amostras com os genes de virulência *stx1* ou *stx2*. Nessas mesmas amostras cinco eram portadoras unicamente do gene *stx1*, duas do gene *stx2* e uma amostra possuía os dois genes em simultâneo. Na exploração B todas as amostras eram portadoras do gene *stx1/stx2*. Em cinco delas só estavam presente o gene *stx2* e nas restantes quinze estavam presentes os dois genes em simultâneo. Quanto à exploração C verificou-se que catorze amostras apresentam o gene *stx1* ou *stx2*. Em nove só estava presente o gene *stx2* e em cinco ambos os genes. Por fim na exploração D

doze amostras possuíam os genes *stx1* ou *stx2*, em que onze eram *stx2* e uma era portadora dos genes *stx1* e *stx2*.

O gene *eae* foi detetado em oito amostras das explorações A e B, não tendo sido detetado nas amostras das explorações B e C.

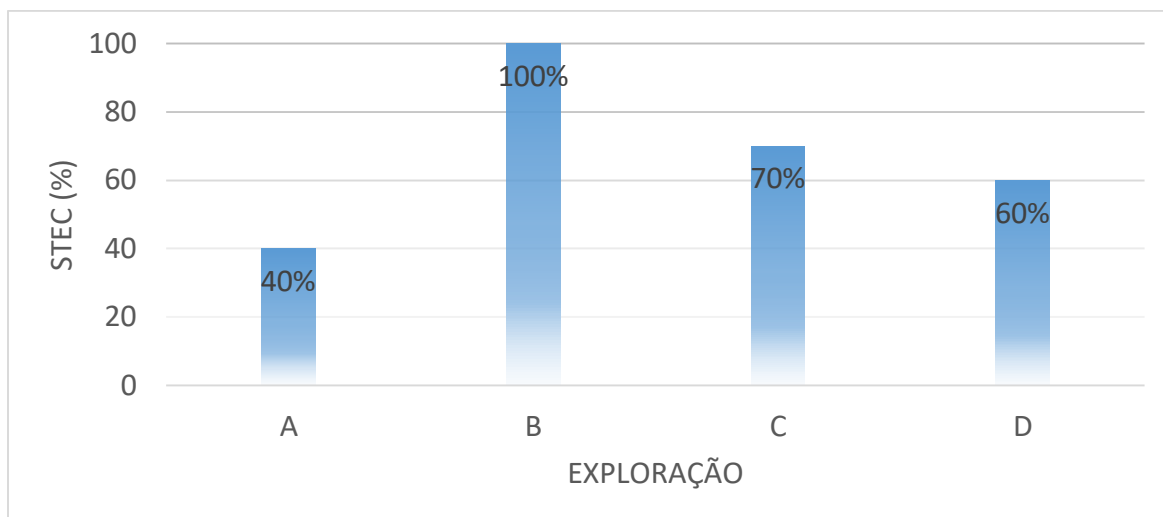


Figura 4.1- Animais colonizados por STEC na exploração A, B, C e D

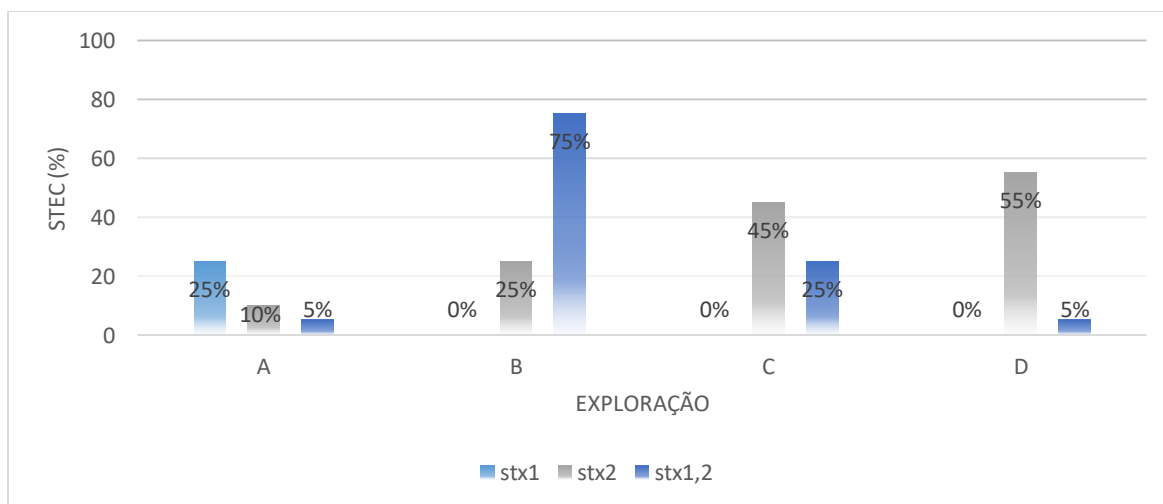


Figura 4.2- Prevalência dos fatores de virulência *stx1*, *stx2* e *eae*

Em suma, a percentagem de animais colonizados por STEC na exploração A, B, C e D foi respetivamente de 40%, 100%, 70% e 60%. Existindo assim uma prevalência quase sempre superior do gene de virulência *stx2* e *stx1/stx2* em três das quatro explorações.

Quanto ao estudo dos serotipos (O) foi possível detetar na exploração A, duas amostras com O145 e três com O103. Na exploração B, sete amostras possuíam O26, catorze possuem O145, uma O104, cinco O157 e uma O103. Na exploração C verificou-se nove com O145 e duas com O103. E por fim na exploração D duas amostras possuíam O26 e uma O145.

Os resultados obtidos nas “pools” provenientes dos enriquecimentos em que se obteve um resultado positivo para os genes *stx1* e / ou *stx2* estão apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2- Resultados da técnica de PCR real time para a presença dos genes de virulência *stx1*, *stx2* nas pools

Animal	Exploração A					Exploração B					Exploração C					Exploração D				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	<i>stx1,2</i>	-	<i>stx1,2</i>	-	<i>stx1,2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	<i>stx2</i>	-	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	-	-	-	-	-	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>stx1,2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>stx2</i>	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	<i>stx2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	<i>stx2</i>	-	-	-	<i>stx2</i>	-	-	-	-	-	-	-	<i>stx2</i>	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>stx2</i>	-	<i>stx2</i>	-
12	-	-	-	-	-	<i>stx1,2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	<i>stx1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	<i>stx2</i>	<i>stx1,2</i>	-	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	<i>stx1,2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1,2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>stx2</i>
19	-	-	-	-	-	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	-

Foi possível constatar a presença dos genes de virulência *stx1/stx2* em vinte e uma amostras (26,25%).

Na exploração A num total de oito amostras, três foram positivas: duas possuíam uma “pool” com o gene *stx2*, e uma possuía quatro pools com o gene *stx1*.

Na exploração B verificou-se que em vinte amostras, onze foram positivas, três amostras continham cinco pools com *stx1* e *stx2* em simultâneo, duas amostras continham três “pools” com *stx1* e *stx2*, outras duas amostras possuíam duas “pools” com *stx1* e *stx2*, duas amostras tinham uma pool com *stx2*, uma outra amostra continha cinco pools em que duas eram *stx1* e *stx2* positivas e três eram *stx2* positiva, por fim uma amostra continha 5 pools portadoras do gene *eae*.

Na exploração C constou-se que em catorze amostras apenas uma era positiva e que continha uma “pool” com o gene *stx2*.

Na exploração D de doze amostras só seis foram positivas, em que três amostras continham uma “pool” com *stx2*, duas amostras possuíam duas “pools” com *stx2* e por fim uma amostra continha cinco “pools” com *stx2*.

Os resultados das colónias que constituíam cada “pool” encontram-se na tabela 4.3.

Tabela 4.3- Resultados da técnica de PCR real time para a presença dos genes de virulência *stx1*, *stx2* nas colónias

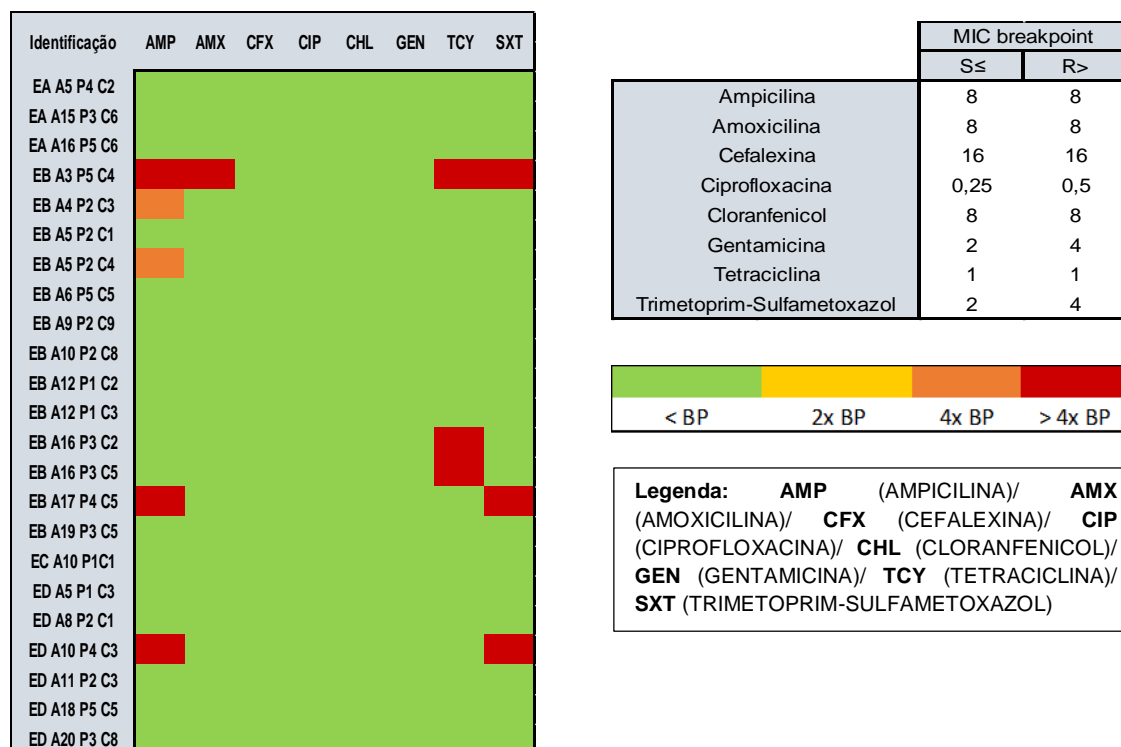
Exploração	Animal	Pool	Colónia									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	5	4	-	stx2	-	-	-	<i>stx2</i>	-	-	-	-
	15	3	-	-	-	-	-	stx1	-	<i>stx1</i>	-	-
	16	5	-	-	-	-	-	stx2	-	-	-	<i>stx2</i>
B	3	5	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	stx1,2	<i>stx1,2</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	4	2	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	stx1,2	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	5	2	stx1,2	<i>stx2</i>	<i>stx1,2</i>	stx2	<i>stx2</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	6	5	<i>stx1,2</i>	-	-	<i>stx2</i>	stx1,2	NT	NT	NT	NT	NT
	9	2	-	-	-	-	-	-	-	-	stx2	-
	10	2	-	-	-	-	-	-	-	stx2	-	-
	12	1	-	stx2	stx1,2	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	16	3	<i>stx1,2</i>	stx1,2	<i>stx1,2</i>	-	stx2	NT	NT	NT	NT	NT
	17	4	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	-	-	stx2	NT	NT	NT	NT	NT
	19	3	<i>stx1,2</i>	<i>stx1,2</i>	-	<i>stx1,2</i>	stx1,2	NT	NT	NT	NT	NT
C	10	1	stx2	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>
D	5	1	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	stx2	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	8	2	stx2	-	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	10	4	<i>stx2</i>	-	stx2	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	11	2	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	stx2	<i>stx2</i>	<i>stx2</i>	NT	NT	NT	NT	NT
	18	5	<i>stx2</i>	-	-	-	stx2	NT	NT	NT	NT	NT
	20	3	-	-	-	-	-	-	-	stx2	-	-

As colónias conservadas em crioviais estão assinaladas a negrito.

Da exploração A, das três amostras positivas, selecionaram-se duas colónias com *stx2* e uma colónia com *stx1*. Da exploração B, das dez amostras positivas, selecionaram-se quatro colónias com *stx1* e *stx2*, três colónias com *stx2*, e por fim selecionou-se de três pools seis colónias, pois nessas três pools existem colónias com genes de virulência diferentes entre elas, logo selecionou-se em cada uma das “pools” duas colónias, uma colónia *stx1/stx2* e outra colónia *stx2*. Na exploração C da única amostra positiva selecionou-se uma colónia *stx2*. Na

exploração D das seis amostras positivas selecionou-se uma colônia *stx2* por “pool”.

Tabela 4.4- “Heatmap” do perfil de resistência dos isolados STEC



Na exploração A nenhum dos isolados STEC apresentou qualquer tipo de resistência a aos antibióticos testados, o mesmo não se pode dizer da exploração B onde encontrou-se 6 isolados resistentes aos antibióticos, sendo a ampicilina o antibiótico com maior número de resistências, quatro, de seguida a tetraciclina, três, depois o trimetoprim/sulfametoxazol com duas resistências e por fim a amoxicilina com uma resistência.

Na exploração C também não se detetou nenhum isolado resistente, enquanto que na exploração D detetou-se um isolado resistente a ampicilina e trimetoprim/sulfametoxazol.

Tabela 4.5- “Heatmap” do perfil de resistência dos isolados não produtores de STEC



Quanto aos isolados não-STE_C foi possível constatar que na exploração A, dez apresentaram resistência aos antibióticos testados, sendo a ampicilina o antibiótico com maior número de isolados resistentes, sete, de seguida a amoxicilina e tetraciclina com seis isolados, depois cloranfenicol com três, a seguir a ciprofloxacina e a gentamicina com dois isolados e por fim o trimetoprim/sulfametoxazol com um isolado.

Na exploração B existem cinco isolados resistentes a mais do que um antibiótico, a ampicilina e a tetraciclina apresentam cinco isolados resistentes, de seguida a amoxicilina com quatro resistentes, o trimetoprim/sulfametoxazol com dois resistentes e por fim a gentamicina e a cefalexina com um resistente.

Na exploração C existem 6 isolados com resistência a mais do que um antibiótico, a gentamicina, a ampicilina e a tetraciclina possuem três resistentes, a amoxicilina duas resistências e por fim o cloranfenicol uma resistência.

Na exploração D só três isolados é que apresentam resistência, dois ao trimetoprim/sulfametoxazol e um a amoxicilina.

Tabela 4.6- Percentagem de antibiótico com maior resistência

Antibiótico	Total de isolados conservados	Total de isolados resistentes	Percentagem
Ciprofloxacina	84	2	2%
Gentamicina	84	6	7%
Amoxicilina	84	14	17%
Ampicilina	84	20	24%
Trimetoprim-Sulfametoxazol	84	8	10%
Cefalexina	84	1	1%
Cloranfenicol	84	4	5%
Tetraciclina	84	18	21%

Na tabela 4.6 apresenta-se a percentagem de isolados resistentes a determinados antibióticos. Num total de 84 isolados conservados encontraram-se dois resistentes à ciprofloxacina (2%), 6 à gentamicina (7%), 14 à amoxicilina (17%), 20 à ampicilina (24%), 8 ao trimetoprim-sulfametoxazol (10%), um à cefalexina (1%), quatro ao cloranfenicol (5%) e por fim 18 à tetraciclina (21%). Convém salientar que cada isolado conservado pode apresentar resistência a mais do que um antibiótico.

Tabela 4.7- Percentagem de resistências a antibióticos nas estirpes STEC e Não STEC conservadas por exploração

Antibióticos	Toxicidade	Resistência por Exploração			
		A	B	C	D
Ciprofloxacina	STEC	0%	0%	0%	0%
	NÃO STEC	12%	0%	0%	0%
Gentamicina	STEC	0%	0%	0%	0%
	NÃO STEC	12%	9%	16%	0%
Amoxicilina	STEC	0%	8%	0%	0%
	NÃO STEC	35%	36%	11%	7%
Ampicilina	STEC	0%	31%	0%	17%
	NÃO STEC	41%	45%	16%	0%
Trimetoprim-Sulfametoxazol	STEC	0%	15%	0%	17%
	NÃO STEC	6%	18%	0%	14%
Cefalexina	STEC	0%	0%	0%	0%
	NÃO STEC	0%	9%	0%	0%
Cloranfenicol	STEC	0%	0%	0%	0%
	NÃO STEC	18%	0%	5%	0%
Tetraciclina	STEC	0%	23%	0%	0%
	NÃO STEC	35%	45%	21%	0%

Na tabela 4.7. é possível verificar a percentagem de resistências aos antibióticos das estirpes STEC e não STEC por exploração.

5.DISCUSSÃO

Determinação da prevalência de STEC e não-STEC

A *E. coli* produtora de toxina Shiga é causadora de doenças gastrointestinais em seres humanos, podendo originar casos fatais de síndrome urémico hemolítico (SUH). Segundo Banatvala *et al.* (2001) que realizaram um estudo prospetivo dos casos de SUH nos EUA e concluíram que 72% dos casos no país eram devidos a STEC.

Através da reação em cadeia da polimerase (PCR), uma reação positiva com primers específicos para *stx1* e *stx2* é suficiente para confirmar a presença de STEC nas amostras (Paton e Paton, 2005), nas quatro explorações pode-se concluir que a maioria das amostras de fezes analisadas apresentaram STEC, e uma pequena quantidade das amostras apresentavam o gene *eae*.

Na literatura encontramos estudos em que a prevalência de STEC é inferior à obtida neste estudo, desde 8,0%, nos EUA Wells *et al.* (1991) e até mesmo 44,3%, na Suíça Busato *et al.* (1999). Por sua vez os resultados obtidos vão de encontro com os descritos por Cerqueira *et al.* (1999) que registou prevalências superiores, como 82% no Rio de Janeiro.

Entre as quatro explorações é evidente que existem diferenças entre elas, na exploração B a prevalência de animais colonizados por STEC foi superior às restantes explorações, sendo a A a que apresentou menor prevalência de animais colonizados por STEC. Esta diferença entre explorações principalmente da A para a B, pode dever-se ao facto de os animais da exploração B serem todas novilhas, ou seja, são animais muito jovens com a idade entre os seis e os vinte e quatro meses, em que o seu sistema humanitário ainda não está completamente desenvolvido, ao contrário das vacas em lactação. Wells *et al.* (1991), afirma que a frequência dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* é superior nas novilhas, também Moreira *et al.* (2003) constatou que as amostras positivas eram maioritariamente nas novilhas.

Na exploração A foi possível verificar que o fator de virulência com maior prevalência foi *stx1*, de seguida *stx2* e por fim *stx1/stx2*, o mesmo já não se pode dizer em relação as seguintes explorações.

Na exploração B o fator de virulência que se evidenciou mais na maioria das amostras foi o *stx1/stx2*, na exploração C o *stx2* foi o que prevaleceu maioritariamente nas amostras, por fim na exploração D o fator de virulência *stx2* foi novamente o que se observou na maioria das amostras. Estes resultados observados comprovam que o fator de virulência *stx2* foi o mais prevalente nas três explorações (B,C e D). Segundo Vicente *et al.* (2005) as sequências, *stx1/stx2* e *stx2* são as que apresentaram maiores coeficientes de prevalência entre as amostras de fezes, também Pigatto *et al.* (2008) encontraram nas fezes de bovinos maioritariamente o gene de virulência *stx1/stx2* e *stx2*.

Estes valores vão de encontro aos obtidos em três das quatro explorações exceto a exploração A, o que nos levou a concluir segundo alguns autores que a exploração A, é a exploração onde a maioria das amostras eram portadoras do gene de virulência *stx1* logo é a que trará menores problemas para a saúde pública pois não está associada a doenças muito graves, apenas a diarreias aquosas. As outras explorações estão mais associadas em causar um maior risco para a saúde pública uma vez que o *stx2* está mais associado a um maior risco de causar SHU e é um gene que apresenta diversas variantes antigênicas o que vai de acordo com a maioria dos autores que relatam que a produção de *stx2* está associada a maior risco de desenvolver doenças Boerlin *et al.* (1999). Sendo novamente a exploração B a que transmite maior risco para o consumidor, uma vez que as amostras foram as que obtiveram maior prevalência de *stx2* podem originar diarreias, febre, fadiga, fraqueza, vômito e fezes escuras com sangue, essa transmissão pode passar para os humanos através do consumo de carne crua, moída ou até mal cozida, através dos laticínios não pasteurizados e através de águas infetada com fezes de animais.

As *E. coli* que são eliminadas nas fezes dos bovinos representam um risco para a saúde pública, uma vez que são um reservatório heterogêneo de serotipos, muitos dos quais podem adquirir resistências, tornando-se assim potenciais riscos toxigênicos para os humanos, principalmente quando entram em contacto com as carcaças e as contaminam Rigobelo *et al.* (2006) ou com o leite Bettelheim *et al.* (2005) não sendo muito comum isso acontecer, aos controlos que os matadouros e as explorações estão sujeitos, mas mesmo assim temos que precaver. Todos os

serogrupos são perigosos, mas a *E. coli* shigatoxigénica O157 é a mais preocupante para o risco de saúde pública pois pode sobreviver por longos períodos no ambiente rural. Por isso mesmo neste mesmo estudo recorremos a tipagem dos serotipos das amostras no enriquecimento sendo testados os seis (O145; O103; O157; O111; O26; O104) mais frequentemente isolados de casos de infeção em humanos.

Foi possível verificar que o serotipo mais comum foi o O145, não tendo sido encontrado nenhum serotipo O111. Em algumas amostras foram encontrados mais do que um serotipo.

Como se pode observar na Tabela (4.1.) existiram amostras que não se conseguiu identificar o serotipo, o que leva a concluir que, provavelmente, estas amostras são portadoras de serotipos que não são os seis pesquisados. Foi possível verificar que a exploração B foi a que possuiu maior diversidade e quantidade de serotipos, e também foi a única exploração onde se encontrou O157 que como foi mencionado anteriormente é o mais preocupante para a saúde humana. Uma vez que também foi a exploração que encontramos maior prevalência de animais colonizados por STEC era de esperar que também possuísse um maior número de serotipos, ou seja uma exploração onde se encontra uma taxa elevada de animais portadores de STEC é de esperar que a taxa de serotipos também seja elevada. Estas diferenças significativas entre explorações, mas principalmente entre a B e as outras três, pode ser explicada por estarmos a falar de animais com faixas etárias diferentes, como foi mencionado anteriormente as fezes desta exploração eram unicamente provenientes de novilhas. Segundo Wells *et al.* (1991) as razões para essas diferenças de prevalência entre faixas etárias são desconhecidas, mas podem refletir disparidade no desenvolvimento ruminal, dieta, resistência a infeções e outros fatores.

Estes valores obtidos na exploração B leva-nos a concluir que apesar da exploração B ser uma exploração recente, as medidas de higiene não estão a ser bem utilizadas nem aplicadas, por exemplo, os bebedouros e comedouros não serem limpos todos os dias, as camas não estarem no melhor estado para o animal, pois se as camas se encontram sujas, húmidas é um fator enorme para existir um maior risco de propagação das *E. coli*.

Com a continuação do estudo foi possível verificar que quando passamos do enriquecimento para as “pools” tabela (4.2) existe um decréscimo das amostras que possuem o gene de virulência *stx1*, *stx2* e *stx1/2*. Essa situação pode dever-se ao facto de estarmos a isolar 50 colónias das centenas que possui a placa do meio de cultura. Na exploração B encontram-se mais esses genes de virulência; faz sentido, uma vez que, é a exploração que possui mais animais portadores de STEC no enriquecimento e na qual se identificaram mais amostras portadoras de serotipos.

Determinação da MIC dos isolados de STEC e não-STE

Em seguimento aos resultados obtidos, testou-se a resistência aos antibióticos tanto nas estirpes produtoras de STEC como nas não produtoras de STEC.

No geral, foi possível verificar que um isolado pode apresentar nenhuma, uma ou até mais do que uma resistência aos antibióticos analisados, e que as resistências aos antibióticos surgem sendo ou não sendo isolados produtores de toxina.

Foi possível verificar que a ampicilina, a tetraciclina e amoxicilina foram os antibióticos que apresentam maior resistência no total dos 84 isolados. Segundo o ECDC (2015) as penicilinas são os grupos de antibióticos mais utilizados em Portugal, o que coincide com os resultados obtidos. Ou seja, os antibióticos mais administrados nos bovinos são as penicilinas, apesar do seu espectro ser estreito é utilizado para tratar bactérias suscetíveis e organismos Gram positivos, logo não seria de esperar que existissem tantas resistências uma vez que os isolados são Gram negativos Os antibióticos que apresentaram menor resistência foi a cefaloxina e a ciprofloxacina.

Contudo foi possível verificar que a exploração com um maior número de resistências foi a B, o que poderá indicar que nesta exploração já foram utilizados por várias vezes antibióticos (como uso terapêutico, ou profilático ou até mesmo através dos alimentos fornecidos aos animais), pelo que as bactérias detetadas acabaram por ganhar resistência a esses antibióticos, estes antibióticos podem ser

administrados de várias formas, via oral, intramuscular e intravenosa, por norma em vacas que estão a passar por uma mastite.

Em contrapartida foi possível verificar que a exploração D foi a que apresentou menores resistências aos antibióticos. Logo será a exploração que trará menor perigo para a saúde pública, uma vez que as *E. coli* STEC são de fácil transmissão para os humanos, uma exploração com uma baixa taxa de STEC não vai transmitir tanto perigo do que uma com alta taxa de STEC.

Estes resultados eram mais que expectáveis, uma vez que estamos a falar animais sensíveis em que facilmente precisam de receber tratamentos, para não existir uma quebra na produção de leite. Assim, tratando-se de animais direccionados para a produção de leite onde o maior lucro do produtor é refletido na maior quantidade de leite produzida, logo tentam aumentar esta mesma produção adicionando aditivos na alimentação como por exemplo monensina de forma a produzir mais, estes aditivos por sua vez possuem princípios ativos que vão originar resistência futuras as bactérias encontradas. Por sua vez o meio de excreção destes antibióticos por norma é via urinária, mas mesmo assim existem muitos que são via fecal, mas nós neste caso realizamos recolhas via fecal.

6.CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos e discutidos neste estudo pode-se concluir que:

- Das quatro explorações estudadas, verificou-se que o número de animais portadores de STEC é muito variável.
- Ao longo da pesquisa o fator de virulência *stx2* foi o que apresentou um maior coeficiente de prevalência no total das amostras.
- O serotipo mais prevalente foi o O145, e o menos prevalente ou inexistente foi o O111.
- Só se detetou o serotipo O 157 numa exploração. Curiosamente, foi na que apresentou maior quantidade e variedade de serotipos.
- A ampicilina é o antibiótico que os isolados apresentaram maior resistência, assim como a tetraciclina e a amoxicilina, e são estes os mais aplicados.
- Os antibióticos em que os isolados apresentaram menor resistência foi a cefaloxina e a ciprofloxacina, também são os menos aplicados
- A exploração B é a que os isolados possuem maiores resistência aos antibióticos sendo a D a que se encontrou menores resistências.
- Estes resultados serviram para uma maior consciencialização sobre a resistência a antibióticos, que tem vindo a aumentar cada vez mais e não se prevê a descoberta de novos antibióticos nos próximos anos, por isso é necessário salvaguardar os antibióticos que ainda são eficazes e os poucos que poderão vir a ser introduzidos no futuro, deve-se consciencializar as comunidades prescritoras para reduzir a prescrição de antibióticos e as comunidades consumidoras para este problema das resistências
- No futuro se abordar novamente este tema existem pontos que teria de melhorar certamente, em primeiro aumentar o número de amostras por exploração, ou seja o número de animais, e repetir esses mesmos animais em duas alturas do ano distintas, também trabalhar com animais todos dentro da mesma faixa etária, e aumentar os números de serotipos a serem estudados.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASAE. (2016). *Escherichia coli*. Retrieved August 15, 2016, from <http://www.asae.pt/>

Arcuri, P.B. e Matos, L. L. (1992). Microbiologia do Rúmen. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, MG, 16, 175, 5-8.

Banatvala, N.A., Griffin, P.M., Greene, K.D., Barrett, T.J., Bibb, W.F., Green, J.H. e Wells, J.G. (2001). The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *Journal of Infectious Diseases*, 183, 1063-1070.

Barbosa, J. (2007). O controlo de medicamentos veterinários não-autorizados na UE. *Segurança e Qualidade Alimentar - Sequali*, 3, 19-21.

Bettelheim, K. A., Kuzevski, A., Gilbert, R. A., Krause, D. O. e Mcsweeney, C. S. (2005). The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. *Journal of Applied Microbiology*. Oxford, 98, 699-709.

Boerlin, P. (1999) Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci*. Basel, 56, 9-10, 735-741.

Busato, A., Hofer, D., Lentze, T., Gaillard, C. e Burnens, A. (1999). Prevalence and infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow-calf farms. *Veterinary Microbiology*, 69, 251-263.

Vicente, H.I.G., Amaral, L.A.e Cerqueira, A.M.F. (2005). Shigatoxigenic *Escherichia coli* serogroups o157, o111 and o113 in feces, water and milk samples from dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 3, 217-222, 2005.

Callaway, T.R., Anderson, R.C., Edrington, T.S., Genovese, K.J., Bishoff, K.M., Poole, Y. S. Jung, Y.S., Harvey, R.B. e Nisbet, D.J. (2004). What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? *J. Anim. Sci*, 82, 93-99

Caprioli A., Morabito, S., Brugère, H. e Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission, 36, 289-311.

Carvalho, P.A., Sanchez, L.M.B. e Viégas, J. (2003). Desenvolvimento de estômago de bezerros holandeses desaleitados precocemente. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32, 6, 1461-1468.

Cerqueira, A.M., Guth, B.E., Joaquim, R.M. e Andrade, J.R. (1999). High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Veterinary Microbiology*, 70, 111-121.

China, B., Pirson, V. e Mainil, J. (1996). Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Application Environmental Microbiology*, 62, 3462-3465.

EFSA e ECDC. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*.

European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC surveillance report: Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012. Stockholm: ECDC; 2014. [citado 8 Ago 2015]. Disponível em: <http://www.ecdc.europa.eu/>.

Farrokh, C., Jordan, K., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condrón, R., Reu, D., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Mischczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K., Cerf, O. (2013). Review of Shiga-toxinproducing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiology*, 162, 190-212.

Frank, C., Werber, D., Cramer, P., Askar, M., Faber, M., An Der Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Kemper, J., Follin, P., Müller, L., King, A., Rosner, B., Buchholz, U., Stark, K. e Gérard, K. (2011). Epidemic profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany – Preliminary report. *The New England Journal of Medicine*, 365, 1771- 1780.

Frazier, C. (1993). *Microbiologia de los alimentos*. Acribia, Zaragoza, España, 681.

Gil, J.I. (2000). *Manual de Inspeção Sanitária de Carnes*. I Volume, 2^o Edição. Serviço de Educação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

Griffin, P. M. e Tauxe, R.V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiologic Reviews*, 13, 60-98.

Hunt, M. (2010). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). *Clinics in Laboratory Medicine*, 30, 21-45.

Kamra, D.N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89, 124-135.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., e Mobley, H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews of Microbiology*, 2, 123-140.

Lascowski, K. M. S., Guth, B. E. C., Martins, F. H., Rocha, S. P. D., Irino, K. e Pelayo, J. S. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 1230-1239.

Lorusso, V., Dambrosio, A., Quaglia, C., Parisi, A., La Salandra, G., Lucifora, G., Mula, G., Virgilio, S., Carosielli, L., Rella, A., Dario, M. e Normanno, G. (2009). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26 in raw water buffalo (*Bubalus bubalis*) milk products in Italy. *Journal of Food Protection*, 72, 1705-1708.

Mercado, E.C. (2007) Síndrome Urémico Hemolítico: por qué Argentina? *Revista Argentina de Microbiología*, 39, 191-192.

Moreira, C. N., Pereira, M. A., Brod, C. S., Rodrigues, D. P., Carvalhal, J.B. e Aleixo, J.A.G. (2003). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Vet Microbiol*, 93, 179-183.

Nataro, J. P. e Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 142-201.

Oliveira, J. S., Zanini, A. M. e Santos, E. M. (2007). Fisiologia, manejo e alimentação de bezerros de corte. *Arq. Ciên. Vet. Zool. Unipar*, 10, 1, 39-48.

Paton, C. e Paton, W. (1998). Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 450-479.

Paton, A.W. e Paton, J.C. (2005). Multiples PCR for direct detection of shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 6, 2944-2947.

Pfeifer, I., Burger, J. e Brenig, B. (2004). Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. *BMC Genetics*, 5, 30-36.

Pigatto, C. P., Schoken-Iturrino, R. P., Souza, E. M., Pedrosa, F. O., Comarella, L., Irino, K., Kato, M. A. M. F., Farah, S. M. S. S., Warth, J. F. e Fadel-Pichet, C. M. T. (2008). Virulence properties and antimicrobial susceptibility of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle from Paraná State, Brazil. *Can J Microbiol*, 54, 588-593.

Puño-Sarmiento, J., Gazal, L. E., Medeiros, L. P., Nishio, E. K., Kobayashi, R. K. T. e Nakazato, G. (2014). Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from avian organic fertilizers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, 9, 8924-8939.

Rigobelo, E.C., Games, H.J., Marin, J.M., Macedo, C., Ambrosin, J.A. e Ávila, F.A. (2006). Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58, 3, 305-310.

Rigobelo, E. C., Stella, A. E., Ávila, F. A., Macedo, C. E. e Marin, J. M. (2006). Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. *Inter J Food Microbiol*. V. 110, p. 194-198.

Rivero, M.A., Padola, N.L., Etcheverria, A.I., Parma, A.E. (2004). *Escherichia coli* enterohemorrágica y Síndrome Uremico Hemolítico en Argentina. *Medicina*, 64, 352-356.

Roberts, A., Baird-Parker, A. e Tompkin, R. (1996). *Microorganisms in foods*. ICMSF: microbial specifications of food pathogens. London: Blackie Academic & Professional.

Stephan, R., Schumacher, S., Corti, S., Krause, G., Danuser, J. e Beutin, L. (2008). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *Journal of Dairy Science*, 91, 2561-2565.

Sousa, J. C. (2006). "Manual de Antibióticos Antibacterianos", 2 Ed, Edições Universidade Fernando Pessoa.

Swerdlow, D., Woodruff, B., Brady, R., Griffin, P., Tippen, S., Donnel, Jr., Geldreich, E., Payne, B., Meyer, Jr., Wells, J., Greene, D., Bright, M., Bean, N. e Blake, P. (1992). A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Annals of Internal Medicine*, 117, 812-819.

Vaz, T., Irino, K., Kato, M., Dias, A., Gomes, T., Medeiros, M., Rocha, M. e Guth, B. (2004). Virulence properties and characteristics of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 903-905.

Vicente, H.I.G., Amaral, L.A. e Cerqueira, A.M.F. (2005). Shigatoxigenic *Escherichia coli* serogroups O157, O11 and O113 in feces, water and milk samples from dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 217-222.

Walsh, C. (2003). "Antibiotics: Actions, Origins, Resistance", 1 ed, ASM Press.

Weagant, S. D., Bryant, J. L. e Jinnemn, K. G. (1995). An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *Journal of Food Protection*, 58, 1, 7-12.

Wells, J. G., Shipman, L. D., Greene, K. D., Sowers, E. G., Green, J. H., Cameron, D. N., Downes, F. P., Martin, M. L., Griffin, P. M., Ostroff, S. M., Potter, M. E., Tauxe, R. V. e Wachsmuth, K. I. (1991). Isolataon of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J Clin Microbiol. Washington*, 29, 985-989.